

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 57-127841

(43)Date of publication of application : 09.08.1982

---

(51)Int.Cl. G01N 27/30

C12M 1/34

C12Q 1/00

G01N 27/40

---

(21)Application number : 56-014129 (71)Applicant : MITSUBISHI

RAYON CO

LTD

(22)Date of filing : 02.02.1981 (72)Inventor : UEHARA

MASARU

UCHIDA

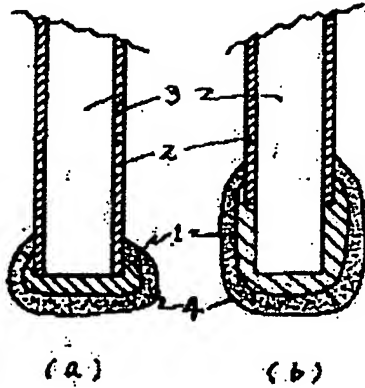
AKITAKA

SAKIMAE

AKIHIRO

---

(54) BIOLOGICAL ELECTROCHEMICAL SENSOR AND MANUFACTURE THEREOF



(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a fine sensor having excellent mechanical strength, by forming an insoluble macromolecular material including enzyme or microorganism directly on the surface of an electrode.

CONSTITUTION: The electrode, which comprises noble metal and whose side is coated by an insulator 2, is coated by a macromolecular porous film 1 and a fixed enzyme film or a fixed microorganism film so as to form a unitary structure. In order to fix

the enzyme or the microorganism directly on the surface of the electrode, aqueous solution including the enzyme or microorganism is frozen at 0°C or less, so that it is contained in the inside of ice blocks. They are mixed with organic solvent wherein an ice insoluble macromolecular material, which is dissolved in the organic solvent and comprises insoluble polymer having high molecular weight is dissolved. Said mixture is attached to the tip of the electrode which is coated by the macromolecular porous film, then the organic solvent is removed so as to form the sensor.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application]

converted registration]

[Date of final disposal for  
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against  
examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal  
against examiner's decision of  
rejection]

[Date of extinction of right]

## ⑫ 特許公報(B2)

平1-22898

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 平成1年(1989)4月28日

G 01 N 27/30

3 5 1

7363-2G

発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 生物電気化学センサーおよびその製造法

⑯ 特 願 昭56-14129

⑰ 公 開 昭57-127841

⑱ 出 願 昭56(1981)2月2日

⑲ 昭57(1982)8月9日

⑳ 発 明 者 上 原 勝 愛知県小牧市大字本庄2597-306  
㉑ 発 明 者 内 田 晃 普 愛知県名古屋守山区大字小幡字小林45  
㉒ 発 明 者 崎 前 明 宏 広島県大竹市黒川3丁目2-6  
㉓ 出 願 人 三菱レイヨン株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番19号  
㉔ 代 理 人 弁理士 吉沢 敏夫  
審 査 官 能 美 知 康  
㉕ 参 考 文 献 特開 昭50-137788 (JP, A)

1

2

## ㉖ 特許請求の範囲

1 貴金属線からなる分離型電極の電極表面に直接高分子多孔質膜が被覆され、該多孔質膜表面に直接固定化酵素膜又は固定化微生物膜が被覆されてなり、該電極と高分子多孔質膜と固定化酵素膜又は固定化微生物膜が一体構造をなしていることを特徴とする生物電気化学センサー。

2 高分子多孔質膜が孔径20Å以上3μm以下の空孔を有する特許請求の範囲第1項記載の生物電気化学センサー。

3 高分子多孔質膜が孔径20Å以上1μm以下の空孔を有する薄い緻密層からなる外層(固定化酵素膜又は固定化微生物膜と接触する側)と、これに連続して一体化した孔径1μm以上の空孔を有する内層(電極と接触する側)からなる特許請求の範囲第1項記載の生物電気化学センサー。

4 予め高分子多孔質膜で被覆した、貴金属線からなる分離型電極の電極表面を、酵素又は微生物を含有した氷塊と水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒との混合物で被覆した後、有機溶媒を除去することを特徴とする生物電気化学センサーの製造法。

5 高分子多孔質膜が孔径20Å以上3μm以下の空孔を有する特許請求の範囲第4項記載の生物電気化学センサーの製造法。

6 高分子多孔質膜が孔径20Å以上1μm以下の

空孔を有する薄い緻密層からなる外層と、これに連続して一体化した孔径1μm以上の空孔を有する内層からなる特許請求の範囲第4項記載の生物電気化学センサーの製造法。

## 5 発明の詳細な説明

本発明は、電極表面に固定された酵素又は微生物を有する生物電気化学センサーとその製造法に関するものであり、更に詳しくは、貴金属線からなる分離型電極の電極表面を、酵素又は生きた微生物を水不溶性高分子膜で包括した固定化酵素膜又は固定化微生物膜で多孔質膜を介して被覆一体化したことを特徴とする生物電気化学センサーとその製造法に関するものである。

近時生物の持つ反応特異性と電気化学デバイスを組み合わせた生物電気化学センサーの開発が行なわれ、特に医療分野に於て、その基質選択性、微量反応性等から、臨床検査手法の変革を可能にするものとして注目されている。

そして、既にアンペロメトリー、ポテンシオメトリーの両電極反応を基本とする酵素電極による生体成分定量法、さらにバイオアッセイ法を応用した微生物電極による微量成分定量法の提案がなされている。

しかしながら、従来提案されている酵素固定化方法あるいは微生物固定化方法(以下両者併せて固定化方法と略す)では、被固定化物の継続的溶

出、失活、立体構造の変化、比活性が低い、基質通過が困難等々の欠点があり、固定方法によつては分子量の制限によつて固定化できないものもあり、その発展が停滞している。又一方、従来の生物電気化学センサーは、電極表面に予め別に形成した酵素あるいは微生物の固定化膜を被覆するものであり、その取扱い及びセンサーの微小化に大きな妨げとなり、これも生物電気化学センサーの発展を阻害していた。又電極表面に酵素あるいは微生物を固定化した膜を被覆した生物電気化学センサーは生体反応により生成または消費した物質を電気化学的に検知するものであるが、被測定物質によつては検知物質の電極反応に影響を及ぼす干渉物質、例えば酵素電極反応の場合、 $\text{Fe}^{+++}$ イオン等の存在によつて精度が著しく低下し、その対策が煩雑であるが故に、折角の生物電気化学センサーの実用が進まない等の問題点も有していた。

本発明者らは、これらの阻害要因を一気に解消して、生物電気化学センサーの実用を進めるべく鋭意検討した結果本発明に到達したものである。

即ち本発明の要旨とするところは、貴金属線からなる分離型電極の電極表面に直接高分子多孔質膜が被覆され、該多孔質膜表面に直接固定化酵素膜又は固定化微生物膜が被覆されてなり、電極、高分子多孔質膜、固定化酵素膜又は固定化微生物膜が一体構造をなしている生物電気化学センサーであり、さらにその製造方法として、予め高分子多孔質膜で被覆した貴金属線からなる分離型電極の電極表面を、酵素又は微生物を含有した氷塊と水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒との混合物で被覆した後、該有機溶媒を除去する生物電気化学センサーの製造法である。

以下本発明を詳しく説明する。

図面は本発明のセンサーの具体例であり、高分子多孔質膜 1 と固定化酵素膜又は固定化微生物膜 4 (以下固定化酵素膜等と略す) が絶縁体 2 で被覆された貴金属よりなる分離型電極 3 へ一体構造をもつて被覆されている。

即ち、従来の固定化酵素膜を用いた電極は、たとえば特開昭54-102193号明細書第2図に示されているごとく、高分子多孔質膜や固定化酵素膜を一旦別途成形し、この膜を電極表面に被覆するという方法がとられている。

このような方法による場合、電極が白金線のような細いものである場合、被覆時に膜が破れたりして非常な困難を伴なう。一方本発明の電極では、酵素の固定化と電極への固定化酵素膜の被覆が製造時に一体化して行なわれるため、非常に微小な電極表面にも被覆が可能であり、さらに製造条件の適当な選択により、被覆膜の厚みや多孔度を任意に選択出来る。さらにこのように電極へ一体固定化されたものは、測定時に固定化酵素膜の脱落が起りにくく外部溶液への浸漬による使用はもちろん、生体組織内へ挿入して測定する場合、安全に使用出来るものである。

本発明のセンサーの第2の特徴は、図から明らかなように固定化酵素等を含まない高分子多孔質膜 1 と酵素や微生物を内部に固定化した固定化酵素膜等 4 の一体積層構造を有することである。

固定化酵素膜等と電極反応の組合せによる電気化学分析法、例えば酵素電極に於ては基質と酵素との反応によつて発生又は消費される。酸素、過酸化水素、炭酸ガス、アンモニアガス、炭酸イオン、水素イオン等の電極活性物質を定量検知するものであるが測定条件、例えばポーログラフイによるアンペロメトリック法に於て酸素を還元する電位に於て同時に還元される $\text{Fe}^{+++}$ などの金属イオンがあるとこれが干渉物質となつて測定を妨害する。

固定化酵素膜等は基質の通過が容易である一方、これらの干渉物質をも通過させたり、あるいはもう一つの測定精度阻害因子である測定系の波動が電極表面に直接到達し易い為、測定精度は低下する。

これらの干渉を除外する為に、薄膜の積層、補正を目的とする複式電極システム等の提案もあるが、前者は薄膜の積層操作が難しい、後者は回路、装置が複雑になる等の欠点を有していた。

本発明は、前記の薄膜積層を改良する為に貴金属線からなる分離型電極の電極先端に予め微細な多孔質膜層を形成し、さらにその上に固定化酵素膜等を形成一体化することにより、効果的かつ簡便に測定精度の高いセンサーを提案するものである。

本発明に云う高分子多孔質膜とは、孔径 $10\text{\AA}$ ~ $5\mu\text{m}$ 、好ましくは $20\text{\AA}$ ~ $3\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $50\text{\AA}$ ~ $1\mu\text{m}$ の孔を有するものである。また高

分子多孔質膜自身を表面に孔径の小さい緻密層と内部を孔径の大きい多孔質を持たせた非対称膜、多層膜とすることによつて基質および電極反応物質の移動速度を調整出来る。この場合、緻密層の孔径は20Å〜1μmの範囲に、内部多孔質膜の孔径を1μm以上にコントロールしたものが良い。

即ち、本発明の生物電気化学センサーが最も有効に使用される生体情報即ち血液、組織液の成分容量を想定した場合、コロイド状と考えられる血液、組織液の無荷圧下での膜内への浸透のためには20Å以上、好ましくは50Å以上の孔径が必要であり、これ以下では乾燥状態の電極を組織又は血流中に挿入した場合、安定した応答が得られる迄に時間がかかる。一方孔径が3μより大になると、組織あるいは血流の動きに応じて孔中での液の運動が起るようになり測定の安定性に欠けるようになり、又干渉物質による影響を受け易くなる。

高分子多孔質膜の孔径は電極表面から膜厚の方向に沿つて、順次小さくなるように分布させるとより効果的である。一方高分子多孔質膜の空孔体積率は、大なる程電極の感度はよく、これは膜の物理的強度との相関に於て決定される。

多孔質膜を形成する素材としては、セルロース、セルロースアセテート、コロジオン膜(硝酸セルロース)、ポリアミドヒドラジド、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレート等の親水性素材あるいはポリカーボネート、エチレンオキシドブロックポリマー、ポリスチレン、ナイロン6、ポリエステル等の疎水性ポリマーで溶媒、膨潤剤による溶解、膨潤が容易なものがあげられ特に孔径のコントロールのし易さ、膜の強度、後述の固定化酵素膜等の形成溶媒との関係等を勘案して決定される。

多孔質膜の厚さは、孔径によつて増減することが好ましく、孔径が小なる場合程薄くする必要があるが大略10〜100μであることが好ましい。

この多孔質膜に続いて、固定化酵素膜等が一体形成される。固定化酵素膜等の製法は、公知の方法が適用出来るが、被固定化物である酵素や微生物が失活しないように注意しなければならない。後述する水塊中に酵素等を包接した後高分子膜でさらに包接する方法が特に好ましい。固定化酵素膜等は、一般に水不溶性の高分子マトリックス中に酵素等が固定化されているものが良く、高分子

マトリックスは微小空孔を多数含む多孔質膜が好ましい。

このような構造を持たせることによつてセンサーと接触する溶液中の基質が酵素等と自由に接触し、反応が速やかに行なわれる。

次に本発明の生物化学的センサーの製造法について述べる。

多孔質膜の作成については、予め電極表面上に作成した緻密膜を膨潤剤で膨潤せしめた後、これを非溶剤で置換して多孔質膜とする方法、高分子溶液を電極表面上に付着させた後、空气中又は溶媒と相溶する非溶剤中で脱溶媒して凝固させる方法等々いかなる方法によつてもよく溶媒も数種の組合せ、溶媒と膨潤剤の組合せ、溶媒-非溶媒混合液の組合せ等々いかなる系を用いてもよい。

孔径の調整は、溶媒、膨潤剤の組合せ、温度、高分子の溶解濃度、溶媒-非溶剤の比率、凝固させるタイミング等々によつて行う。又孔径の分布を持たせる為に、膜形成を複数回にわたつて、順次積み重ねる形で行なつてもよい。

得られた多孔質膜は、さらにアニーリングによつて、孔径の調整あるいは膨潤強度の調整を行なつてもよい。

次にこのように貴金属線からなる分離型電極の電極表面に一体成形された高分子多孔質膜上に固定化酵素膜等を一体成形する。

酵素又は微生物の固定化方法は、各種の方法が提案されているが中でも包括法と称される方法は、被固定化物の活性を低下せしめることの少ない方法として広く用いられている。

即ち酵素や微生物を水不溶性高分子物質で包括して固定化する方法として、水溶性単量体あるいは水溶性高分子物質と水溶性架橋剤を酵素あるいは微生物とともに水に溶解せしめたのちこれを過硫酸カリ等の重合触媒あるいはγ線等の放射線で重合をおこさせると同時に架橋構造を与え生成した水不溶性高分子ゲル中に酵素や微生物を包括する方法とか、水不溶性単量体あるいは水不溶性高分子物質が溶解している有機溶媒中に酵素や微生物を含有する水溶液を微小な水滴として分散せしめたのち重合を行なわしめたり、あるいは水不溶性高分子物質を溶解している有機溶媒を除去したりしてこの水滴を水不溶性高分子物質で包括する方法などが知られている。

しかしながら、これら従来の方法は次のような欠点を有するものである。即ち、酵素や微生物は一般に水中においては比較的安定であるが有機溶媒中では不安定であり、従来の方法では包括材料としては水溶性のことが多い。水溶性の材料を用いる場合には、重合や架橋などによつて水溶性の材料を不溶性にする操作が必要であり、それらの操作によつて酵素や微生物の変質は免れない。又包括材料として水不溶性高分子物質を用いようとすると、これらを溶解するために、有機溶媒を用いる必要があり、有機溶媒により酵素が失活したり微生物が死滅したりする場合が多い。本発明者の一人である崎前らは、これら従来の方法がもつ欠点を解決すべく研究し、有機溶媒中で酵素や微生物を水不溶性高分子物質で安定に包括する方法に関し、いくつかの提案を行なつている（特開昭54-105289、特開昭55-135591）。更にその改良方法として、固体構造物の表面を酵素又は微生物を包括した水不溶性高分子物質で被覆することにより機械的強度が優れ、しかも固体構造物の形状に合わせた各種の成型された薄膜状の固定化酵素又は固定化微生物が容易に製造できることを見出した。

本発明者らは、その方法を応用して電極表面に直接酵素又は微生物を固定化せしめた生物電気化学センサーが、その活性、耐久性及び応用性に優れた性能を有することを見出し本発明に到達した。

即ち、酵素又は微生物を含有した氷塊と水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒との混合物で電極表面を被覆したのち有機溶媒を除去することの特徴とする固定化された酵素又は微生物を電極表面に有する生物電気化学センサーとその製造方法である。

本発明で使用する酵素は動植物組織から得られたものでも、あるいは微生物が産生したものでも、その供給源を問わず使用できる。また酵素は精製されたものでも未精製のもの、例えば酵素含有組織のホモジネートや微生物細胞のようなものでも差しつかえない。

本発明で使用する酵素は特に制限されないが、例えば特開昭54-105289号に記載された各種酵素が全て使用されうる。

又、本発明で使用する微生物はカビ、酵

素、細菌、放線菌、不完全菌に分類される微生物であり、その種類は特に制限されないが、例えば特開昭55-135591号に記載された各種の微生物が全て使用されうる。

これらの微生物は栄養培地で生育せしめられたのち、生きた状態で使用されうる。ここに生きた状態とは微生物が自己再生能力を有することであり、微生物の生育に適する環境下で培養することにより確認することができる。

本発明で使用する酵素又は微生物を含有する氷塊は、上記の酵素や微生物を含有する水溶液を0℃以下に凍結し、氷塊の内部にこれらを包含せしめたものである。この氷塊は酵素や微生物を含有する水溶液を深冷された雰囲気中に分散せしめると同時に急速凍結を行ない調製することができる。深冷された雰囲気としては冷却されたガスあるいは液いずれでもよいが、好ましくは液状の冷却媒体を用いるのがよい。

液状の冷却媒体としては、凝固点が0℃以下の液状物、例えばメタノール、エタノール、アセトン、酢酸エテル、二塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭酸、エチルエーテル、テトラヒドロフラン、トルエン、n-ヘキサン、石油エーテル、液体窒素、液体酸素などであり、これらを冷却するには蒸発熱を利用したり、ドライアイス等を投入して直接冷却するか、又は冷凍機などにより間接に冷却する方法などがとられる。

酵素又は微生物を含有する水溶液を液状冷却媒体を用いて凍結するに際しては、これらを含有する水溶液を容器等に入れて間接的に凍結してもよく、又液状冷却媒体中で直接凍結させてもよい。

冷却媒体中で直接凍結する場合においては、酵素の失活あるいは微生物の死滅を極力抑えるために、冷却媒体の温度をできるだけ低温にし更に水溶液を噴霧器などを用いて、微小水滴化して急速凍結することが望ましい。又微小水滴化する為に予め、酵素あるいは微生物の水溶液を界面活性剤を用いてn-ヘキサン、石油エーテル等の飽和炭化水素系の溶媒に分散させておいてもよい。

本発明で使用する氷塊は、酵素や微生物以外に次の物質を共含有したものでもよい。例えばポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、タンパク質、核酸、多糖等の水溶性高分子物質、グリセリン等の多価アルコール類、ジメチルスルホ

オキサイド等の極性有機溶媒、シヨ糖、乳糖などの少糖類、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸類、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸等の有機酸、マグネシウム、マンガン、コバルト、カルシウム等の金属塩類、粉末活性炭、珪藻土、ラテックス等の微小な固形物が挙げられる。その他特に酵素の場合は該酵素の基質、反応生成物、補酵素なども共含してもよい。これらの物質は主に固定化操作中における酵素や微生物の保護、あるいは固定化後の製品の物性改良を目的として使用されるのであり、酵素や微生物を含有する水溶液に加えられたのち、急速凍結されて氷塊中に共含せしめられる。

本発明で使用される水不溶性高分子物質とは有機溶媒に溶解し水に不溶な高分子量の重合体であり、0℃以下の有機溶媒にわずかでも溶解するものならばすべて本発明に使用できるが、好ましくは0℃以下の有機溶媒に0.1重量%以上溶解する水不溶性高分子物質が適当である。ここで水不溶性高分子物質が有機溶媒に溶解することは水不溶性高分子物質が有機溶媒と相分離を起こさない濃度で有機溶媒と均一に混合していることである。

本発明で使用される代表的な水不溶性高分子物質としてはポリアクリロニトリル、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネートなどのホモポリマーまたはこれらホモポリマーを構成する単量体を成分とするようなコポリマー、あるいは酢酸セルロース、エチルセルロースのようなセルロース誘導体などであるが、もちろんこれだけに限定されるものではない。これらの水不溶性高分子物質を0℃以下で0.1重量%以上溶解する有機溶媒は0℃以下で液体で存在するもののなかから選ばれ、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、アセトン、メチルエチルケトン、酢酸エチル、二塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、エチルエーテル、トルエン、キシレン、 $n$ -ヘキサン、石油エーテル、テトラヒドロフラン、シクロヘキサン、 $N$ ,  $N'$ -ジメチルホルムアミド、 $\gamma$ -ブチロラクトン、アセトニトリルなどが好ましく使用されるが、もちろんこれらに限定されるものではない。

水不溶性高分子物質はこれらの有機溶媒に溶解

せしめられたのち、0℃以下に冷却されて使用される。

酵素又は微生物を含有した氷塊と水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒との混合物とは、氷塊を水不溶性高分子物質を溶解した0℃以下の有機溶媒中に懸濁状態で分散せしめたものである。分散せしめるにあたっては、水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒に別途調製した氷塊を加えて急速攪拌などにより懸濁状に分散せしめてもよく、また冷却下の水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒中に酵素又は微生物を含有する水溶液を微小水滴として直接分散させて急速凍結しこれらを含む氷塊を生成させてもよい。

氷塊を有機溶媒に均一に分散させるためには氷塊の粒径が小さい程効果的であり、氷塊の大きさとして直径が1mm以下のものを使用することが好ましい。又一旦分散された氷塊を有機溶媒中で安定に維持するためには、氷塊分散時に氷塊とともに該水不溶性高分子物質の非溶媒を適量加えてもよい。特に氷塊の比重と水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒との比重が異なる場合は、一旦分散された氷塊は攪拌を停止すると有機溶媒と分離してしまう。

このような場合には非溶媒を加えることにより氷塊を有機溶媒中に安定に分散せしめることができる。氷塊とともに該水不溶性高分子物質の非溶媒を加えるときは、氷塊を該水不溶性高分子物質の非溶媒に一旦スラリー化したのち、このスラリーを水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒中に急速攪拌下で加えれば良い。この場合、氷塊は非溶媒とともに水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒中に分散されるため、氷塊の周辺で水不溶性高分子物質が凝固し、更にこの凝固した水不溶性高分子物質が過剰の有機溶媒になかば溶解された状態が形成され、その結果氷塊は水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒中に安定に分散される。更に又、これをより効果的に行なうために氷塊中にポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等の水溶性高分子物質あるいはグリセリン、エチレングリコール等の多価アルコールなどを共含させることもできる。氷塊の分散性の向上を目的として使用される非溶媒は水不溶性高分子物質を溶解せず0℃以下で液状の溶媒であり、水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒と混和するもの



から選ばれる。

本発明は、かくして得られた酵素又は微生物を含有した氷塊と、水不溶性高分子物質を溶解した有機溶媒との混合物であるドープを多孔質膜で被覆した分離型電極先端に付着せしめた後、該ドープから有機溶剤を除去せしめ、水不溶性高分子マトリックス中に酵素或いは微生物を固定化した膜を電極表面に直接形成せしめるものである。この多孔質膜で被覆された電極先端を前記の氷塊を含む混合物で被覆せしめるときは、例えば多孔質膜で被覆された電極先端を氷塊と水不溶性高分子物質を含む有機溶媒の混合物中に浸漬したり、あるいは表面に塗布したりすることにより電極先端の表面を混合物で被覆することができる。これらの操作は連続的でも回分的でも可能である。次いで電極先端表面を被覆した混合物から有機溶剤を除去するには、減圧下で有機溶媒を蒸発させてもよく、あるいは水不溶性高分子物質の非溶媒中で凝固させるなどの方法によってもよい。

酵素や微生物は水の内部に包含されている間は有機溶媒が共存しても安定であるが、氷が融解すると有機溶媒による酵素の失活あるいは微生物の死滅が起こる危険性があるため氷が融解する前に包括物から有機溶媒を除去することが好ましい。

このようにして有機溶媒を除去した氷の包括物は、そのまま冷凍保存し使用前に融解して固定化酵素あるいは固定化微生物として用いることができるが、更にこのものを真空凍結乾燥装置等を用いて凍結乾燥することにより保存や輸送に便利な形態とすることができる。

本発明は、貴金属線からなる分離型電極の電極先端の表面に直接酵素や微生物を包括した水不溶性高分子物質を形成させるという全く新規な生物電気化学センサー及びその製造方法を提供するものである。従来法が酵素又は微生物を有機溶媒中に安定に存在せしめた状態で包括を行なっていないため、既に述べたような種々の欠点が生じるのに対し、本発明によればこれら従来の欠点は解決され、現在工業的に汎用されている各種の水不溶性高分子物質の使用が可能になり、固体の構造体に支持された機械的強度の優れた固定化酵素膜又は固定化微生物膜を有する生物電気化学センサーが容易に製造できる利点を有する。更に又、本発明は電極先端表面に薄膜状に酵素や微生物を包括

した水不溶性高分子物質膜を形成させるため反応に關与する物質の透過性が著しく改善された効率のよい生物電気化学センサーが酵素、微生物の種類によらず自由に再現性よく得られる利点も有する。又包括法によるため得られたセンサーの活性の発現性、耐久性が高い。

又、本発明によれば、センサーを微小化することが出来るので、特に少量の試料での測定が要求される血液、尿、組織液等の医療分野での定量、さらには血管、組織等への直接挿入による測定迄可能となる。

以下実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

#### 実施例 1

グルコースオキシダーゼ（ペーリンガー社製約100単位/mg、以下GODと略す）をイオン交換水に溶解後、スプレーで微小な水滴としてドライアイスに冷却された $-70^{\circ}\text{C}$ のn-ヘキサン中に吹き込み急速凍結を行って、GODを含有する微小な氷塊を生成せしめた。この氷塊を手早くブフナーロートで分別して回収した。この氷塊約50gr及びn-ヘキサン約65grを冷却された二塩化メチレン200gr中に加えて氷塊スラリーを調整した。このスラリーを別途調整した3.0重量%のセルローストリアセテート（以下CTAと略す）を溶解した $-20^{\circ}\text{C}$ の二塩化メチレン400gr中に急速攪拌下で徐々に加えて氷塊を分散したCTAのドープを調整した。このドープを $-40^{\circ}\text{C}$ 付近まで冷却して粘度を調整した。

一方、ポリウレタンコートした直径300 $\mu\text{m}$ に白金線の先端を、白金線の長さ方向に直角になるようにして、鋭利なナイフで切断し、白金の新しい断面を露出させた。この白金線の先端を98%ギ酸にCTA濃度5.0重量%に溶解したCTAギ酸溶液の液面に接触させ、白金線の先端断面にCTAのギ酸溶液を付着させたのち常温のイオン交換水中に浸漬し、脱溶剤を行つた。この操作を3回繰り返して行い、白金線の先端にCTAの多孔質膜を形成させた。この膜は膜厚約15 $\mu\text{m}$ 、平均孔径0.5 $\mu\text{m}$ であつた。

このCTA多孔質膜で被覆処理された白金線を上記GODの氷塊を分散したCTAドープに浸漬し、白金線のCTA多孔質膜上に該ドープを付着せしめ、ついで冷却されたトルエン浴中でCTA

を凝固させた。

この付着操作を5回繰り返し、白金先端のCTA多孔質膜上に氷塊を包括したCTA凝固膜を形成させた。この凝固膜に含浸されているトルエンを冷却されたn-ヘキサンで抽出除去し、ついで冷却されたエタノールでn-ヘキサンを抽出除去し、この後、該白金線をM/10リン酸緩衝液(pH7.0)に浸漬し、凝固膜内に包括されている氷塊を融解せしめ、平均150 $\mu$ mのCTA膜で被覆された白金酵素電極を得た。

この固定化GOD白金電極及び銀/塩化銀電極を温度37.0℃のM/10リン酸緩衝液(pH7.2) 100 ml中に浸漬し、スターラーによる攪拌下にて印加電圧-0.6Vで酸素の電解電流値を求め、ついでグルコースを1.0重量%溶解したM/10リン酸緩衝液(pH7.2)を1 mlずつ添加し、各グルコース濃度における酸素の電解電流値を測定した。その結果、グルコース濃度(0 mg/100 ml~500 mg/100 ml)と電解電流値との間に直線関係が存在し、グルコース測定電極として使用できることが判明した。又乳酸1重量%、アルブミン4重量%を含むM/10リン酸緩衝液(pH7.2)を用いて上記と同様の手法により、グルコース濃度と酸素の電解電流値との関係を求めたところ、上記と同一の結果を得た。

更に、この電極を用いて1回/日、6ヶ月間にわたり、グルコース濃度を測定した結果、この酵素電極の活性低下率は3%であった。なおこの電極のスターラー攪拌によるノイズは約2%であり、安定化までの時間は約20秒であった。

#### 実施例 2

実施例1と同様の手法により新しい白金断面を露出させた直径300 $\mu$ mのポリウレタンコート白金線の先端に実施例1のCTA5%ギ酸溶液を接触させ、断面先端にCTAギ酸溶液を付着させたのち、約60℃のイオン交換水中でCTA膜を再生させたのち、再び上記CTAギ酸溶液に接触させ、常温でわずかに風乾した後、約50℃のイオン交換水中に浸漬させ白金線の先端にCTAの多孔質膜を形成させた。この多孔質膜は、走査型電子顕微鏡観察の結果、二層構造からなり、内層は膜厚約20 $\mu$ m、平均孔径約3.5 $\mu$ m、最外層は膜厚約8 $\mu$ m、平均孔径約0.3 $\mu$ mであった。

上記方法により調整したCTA多孔質膜で被覆された白金線を、実施例1で用いたGODを含む氷塊を分散したCTAドープを用い、実施例1と同様の手法により、CTA多孔質膜の表面にGODを包括固定した白金酵素電極を得た。この白金線電極の膜厚は約180 $\mu$ mであった。この固定化GOD白金電極を用い、実施例1と同様の手法でグルコース濃度(0 mg/100 ml~500 mg/100 ml)と酸素の電解電流値との関係を求めた結果、直線関係が存在し、グルコース測定用電極として使用できることが判明した。

なお、この電極は実施例1の電極に比べ、スターラー攪拌によるノイズの影響が約1.5%と低く、安定化までの時間が約15秒と短縮できた。

#### 図面の簡単な説明

図は本発明の生物化学センサーの一具体例の断面図である。

1……高分子多孔質膜、2……絶縁体、3……貴金属電極、4……固定化酵素膜等。

